

P20953.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :H. SUSAKI et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed :October 29, 1999

PCT/JP99/06016

For :DDS COMPOUND AND METHOD FOR MEASUREMENT THEREOF

CLAIM OF PRIORITY

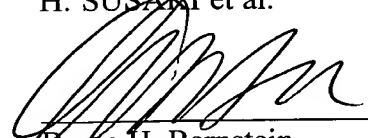
Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application Nos. 10/310130, filed October 30, 1998 and 10/329272, filed November 19, 1998. The International Bureau already should have sent certified copies of the Japanese applications to the United States designated office. If the certified cop have not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
H. SUSAKI et al.



Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027

April 27, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

Reg no. 33,094

THIS PAGE BLANK (USPTO)

日本国特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

29.10.99

REC'D 20 DEC 1999

WIPO PCT

JP 99/6016
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1998年10月30日

出願番号
Application Number:

平成10年特許願第310130号

出願人
Applicant(s):

第一製薬株式会社

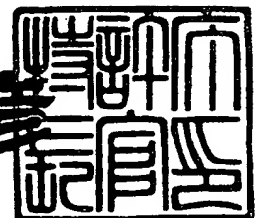
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年12月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特平11-3083768

【書類名】 特許願

【整理番号】 98019M

【提出日】 平成10年10月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 薬物複合体

【請求項の数】 22

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

 【氏名】 洲崎 浩

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

 【氏名】 井上 和泓

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

 【氏名】 久我 洋

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

 【氏名】 池田 政浩

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内

 【氏名】 塩瀬 能伸

【特許出願人】

 【識別番号】 000002831

 【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 薬物複合体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含む薬物複合体。

【請求項 2】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した請求項 1 に記載の薬物複合体。

【請求項 3】 スペーサーが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸である請求項 2 に記載の薬物複合体。

【請求項 4】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 5】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである請求項 4 に記載の薬物複合体。

【請求項 6】 カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物残基を結合させることにより製造することができる薬物複合体。

【請求項 7】 該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる請求項 6 に記載の薬物複合体。

【請求項 8】 カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物残基を結合させることにより製造することができる請求項 6 又は 7 に記載の薬物複合体。

【請求項 9】 カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物残基がスパーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる薬物複合体。

【請求項 10】 該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる請求項 9 に記載の薬物複合体。

【請求項 11】 カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に 1 個のアミノ酸からなるスパーサー又はペプチド結合した 2～8 個のアミノ酸からなるスパーサーを介して医薬化合物残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる請求項 9 又は 10 に記載の薬物複合体。

【請求項 12】 糖化合物がガラクトース誘導体である請求項 1 ないし 11 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 13】 ガラクトース誘導体又はクラスター化されたガラクトース誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01～1.0 である請求項 12 に記載の薬物複合体。

【請求項 14】 カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 15】 カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求項 1 ないし 14 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 16】 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求項 1 ないし 15 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 17】 医薬化合物が抗腫瘍剤である請求項 16 に記載の薬物複合体。

【請求項 18】 医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インド

リジノ [1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求項 1 ないし 17 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体。

【請求項 19】 肝臓癌治療剤である請求項 18 に記載の薬物複合体。

【請求項 20】 請求項 1 ないし 19 のいずれか 1 項に記載の薬物複合体の製造に使用するための糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

【請求項 21】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

【請求項 22】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる薬物担体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた薬物複合体に関するものである。

【0002】

【従来技術】

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

【0003】

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖化合物を薬物担体として用い、該薬物担体に対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 W094/19376号には、カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1～8）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキシソルピシン、ダウノルピシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合した薬物複合体が開示されている。また、特公平7-84481号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入した薬物複合体が開示されている。

【0004】

これらの薬物複合体は、薬物担体に結合された抗腫瘍剤を単独で用いた場合に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。本発明者らは、多糖化合物などの薬物担体と抗腫瘍剤などの医薬化合物とを1から8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合させることにより、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができる薬物複合体を提供している（国際公開W097/46260号）。また、カルボキシC₁₋₄アルキルデキストランポリアルコールが薬物担体として極めて優れた性質を有していることを見出し、カルボキシC₁₋₄アルキルデキストランポリアルコールを薬物担体として含む薬物複合体を提供した（上記国際公開）。

【0005】

その他、ポリアルコール化多糖化合物を薬物担体として用いた薬物複合体に関する技術については、「多糖－ペプチド－ドキシソルピシン複合体に関する研究・多糖化合物の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第10回日本DDS学会講演要旨集，279，1994）；「多糖－ペプチド－ドキシソルピシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第9回日本薬物動態学会年会講演要旨集，292，1994）；第19回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集，D-9，1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第12回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集，51，1995）などの報告がある。

【0006】

一方、多糖化合物などの薬物担体の臓器指向性を高める方法として、例えば、糖修飾ポリグルタミン酸誘導体（特開平5-178986号公報）、糖修飾ポリリジン誘導体（特開平5-222187号公報）、ポリ- ϵ -置換-L-リジンのD-ガラクトピラノシル-グルコン酸誘導体（特開平7-70311号公報）、糖修飾ポリ- ω -置換-L-グルタミン酸誘導体（特開平7-228688号公報）、リンカーを介して糖化合物を結合させた多糖化合物（特開平8-85703号公報）、及びグルコシル-蛋白誘導体（特開平9-118699号公報）などが知られている。しかしながら、従来、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを薬物担体として利用した薬物複合体の臓器指向性を高める方法は報告されていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを薬物担体として含む薬物複合体の臓器指向性（例えば肝臓への指向性など）を高める手段を提供することにある。本発明の別の課題は、上記の特徴を有する薬物複合体を提供することにある。また、本発明のさらに別の課題は、上記の特徴を有する薬物複合体の製造用原料として有用な多糖化合物を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを薬物担体として用いると、極めて臓器指向性の高い薬物複合体を製造することができ、特にガラクトースを結合させたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを含む薬物複合体は優れた肝臓指向性を有していることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0009】

すなわち本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含む薬物複合体を提供するものである。この発明の好

ましい態様によれば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合した上記薬物複合体；スパーサーが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸である上記薬物複合体；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである上記薬物複合体；及び、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである上記薬物複合体が提供される。

【0010】

また、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物残基を結合させることにより製造することができる薬物複合体が提供される。この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスパーサーを介して結合させることにより製造することができる上記薬物複合体；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物残基を結合させることにより製造することができる上記薬物複合体が提供される。

【0011】

さらに、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物残基がスパーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる薬物複合体が提供される。この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる上記薬物複合体；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシ

ル基に1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる上記薬物複合体が提供される。

【0012】

本発明のさらに好ましい態様によれば、糖化合物がガラクトースである上記薬物複合体；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記薬物複合体；ガラクトース誘導体又はクラスター化されたガラクトース誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり0.01～1.0である上記薬物複合体；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記薬物複合体；医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記薬物複合体；及び肝臓癌治療剤である上記薬物複合体が提供される。

【0013】

別の観点からは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる薬物担体；及び上記薬物複合体の製造に使用するための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが提供される。また、別の観点からは、上記薬物複合体の製造のための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

【0014】

【発明の実施の形態】

本発明の薬物複合体は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに

結合した医薬化合物の残基とを含むことを特徴としている。より具体的には、本発明の薬物複合体は、(1) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介さずに結合している場合；及び(2) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合のいずれをも包含する。

【0015】

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合の例としては、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが1個のアミノ酸からなるスペーサーで結合している場合、又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合している場合などを挙げることができる。本明細書において用いられる「修飾」という用語は、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合によって結合した状態を含めて最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。

【0016】

薬物複合体に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーとの結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物残基は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基、スペーサーに存在する反応性官能基（例えば、ペプチドスペーサーを用いる場合には、そのN末端アミノ基若しくはC末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基）に結合していてもよい。また、

本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

【0017】

本明細書において医薬化合物の残基とは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーと医薬化合物残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が $D-NH_2$, $D-COOH$, $D-COOR$, $D-OH$, $D-SH$, $D-CO-NH_2$, $D-NH-COOR$ (R は低級アルキル基等) で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ $D-NH-$ ($D-NH-CO-Q$ など), $D-CO-$ ($D-CO-NH-Q$, $D-CO-O-Q$, $D-CO-S-Q$ など), $D-CO-$ ($D-CO-NH-Q$, $D-CO-O-Q$, $D-CO-S-Q$ など), $D-O-$ ($D-O-CO-Q$, $D-O-Q$ など), $D-S-$ ($D-S-CO-Q$, $D-S-Q$ など), $D-CONH-$ ($D-CO-NH-CO-Q$ など), $D-NH-CO-$ ($D-NH-CO-O-Q$, $D-NH-CO-NH-Q$ など) で表される (カッコ内はスペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物残基との結合を示し、 Q はスペーサー及びカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからそれぞれ反応性官能基及びカルボキシル基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサーと医薬化合物残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

【0018】

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ピンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤 (シスプラチン若しくはその誘導体)、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体 (特開平6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等) などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、

例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

【0019】

医薬化合物の残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとを結合するスペーサーとして、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを用いる場合には、該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

【0020】

好ましいスペーサーは2～6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 α -アミノ酸のほか、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような α -アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で多糖化合物に近接した位置に配置されることが好ましい。

【0021】

例えばオリゴペプチドスペーサーを用いる場合の結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのC末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスペーサーの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の α -アミノ基及び ϵ -アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどの

ジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がN末端のスペーサー及び両末端がC末端のスペーサーを利用してよい。

【0022】

オリゴペプチドからなるスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが $-X-Z-$ で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、 $-X-Z-$ は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば $-X-Z-X-Z-$ 、 $-X-Z-X-Z-X-Z-$ など）を有していてもよい。

【0023】

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離する。従って、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明の薬物複合体の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、 $-X-Z-$ で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

【0024】

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載され

た抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されことなく、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

【0025】

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、薬物複合体に必要な応じて用いられるスペーサーは以下のものに限定されることなく、スペーサーを利用すべきか否かの選択、あるいはスペーサーを用いる場合にその種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合した薬物複合体の Walker 256担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

【0026】

【表1】

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

【0027】

本発明の薬物複合体は、薬物担体として、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有することを特徴としている。本発明の薬物複合体におけるカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

【0028】

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、 α -D-1,6-結合を任意の割合で含んでいてもよい。例えば、 α -D-1,6-結合の割合が 85%以上、90% 以上、又は95% 以上の

デキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば 1,000程度から 2,000,000程度のもの、好ましくは 3,000程度から 800,000程度のものを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル基を構成する C_{1-4} アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の C_{1-4} アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

【0029】

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ヨウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 α -クロルプロピオン酸、 α -メチル- α -クロルプロピオン酸、 β -クロルプロピオン酸、 α -メチル- β -クロルプロピオン酸、 α -クロル酪酸、 β -クロル酪酸、 γ -クロル酪酸などのハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部分的又は完全にカルボキシ C_{1-4} アルキル化することにより行うことができる。

【0030】

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、*N,N*-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ C_{1-4} アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、0.

0.1～2.0の範囲、好ましくは0.1～1.0の範囲である。

【0031】

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、薬物複合体が指向すべき臓器の種類や体内動態などの条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合の種類は特に限定されない。糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが、例えば、 $O-\alpha$ -グリコシド結合又は $O-\beta$ -グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対する糖化合物の導入量（置換度）は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり0.01-1.0程度である。

【0032】

リンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、 $-O-(CH_2)_n-NH-$ （ n は1～16の整数）又は $-(O-CH_2CH_2)_m-NH-$ （ m は1～10の整数）で表されるリンカーを利用することが好ましい。これらのリンカーのO末端又はN末端、好ましくはO末端を糖化合物に $O-\alpha$ -グリコシド結合又は $O-\beta$ -グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

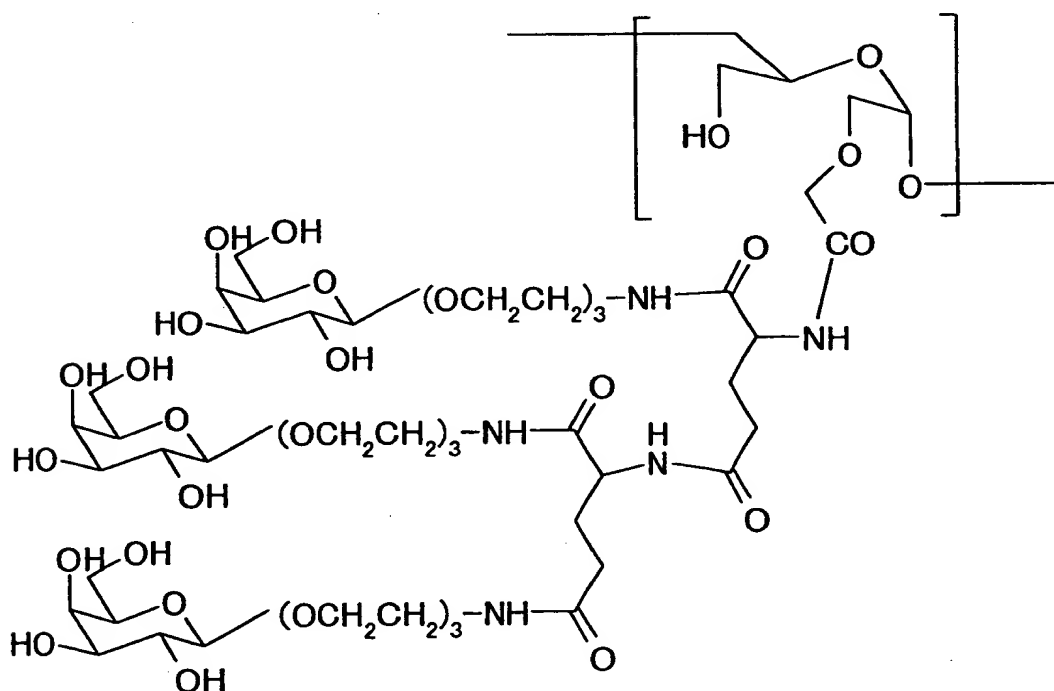
【0033】

また、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いることにより、クラスター修飾体を製造することもできる。クラスター修飾体は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対してクラスター修飾に適す

るリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させた化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又はBiol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。本発明の薬物複合体におけるクラスター修飾の一例を下記に示す（下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシC₁₋₄アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示しており、医薬化合物の残基は省略してある）。もっとも、本発明の薬物複合体に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることはなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。

【0034】

【化1】



【0035】

単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロー

スなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-O-ベンゾイルグルコース、6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、シュークロース、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはN-アセチルガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

【0036】

本発明の薬物複合体の製造方法は特に限定されないが、以下に一般的な製造方法を示す。また、その一例を本明細書の実施例に具体的かつ詳細に示した。当業者は、下記の一般的説明及び実施例に記載された製造方法を参照しつつ、製造原料、反応試薬、及び反応条件などを適宜選択し、必要に応じてそれらの方法に修飾や改変を加えることにより、本発明に包含される薬物複合体を容易に製造することが可能である。一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを適宜の方法に従って糖化合物で修飾し、該修飾体を医薬化合物の残基又は医薬化合物に結合したスペーサーと反応させることにより、本発明の薬物複合体を製造することができる。通常は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールをナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液として調製し、糖化合物の修飾及び医薬化合物（又は医薬化合物に結合したスペーサー）との反応を水中、又は含水有機溶媒中で行うことができる。

【0037】

あるいは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で

修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有機アミン塩の形態に変換し、その後の反応を実質的に水を含まない有機溶媒中で行うことも可能である。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩などを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、 H^+ 型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

【0038】

医薬化合物自体とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合、又は医薬化合物を結合させたスペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はスペーサーの反応性アミノ基（ペプチドスペーサーではN末端アミノ基など）とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを、酸アミド結合させればよい。もっとも、スペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、ペプチドスペーサーのC末端カルボキシル基又は医薬化合物のカルボキシル基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いて

それぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

【0039】

医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はペプチドスペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)のようなN,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAPC)等のカルボジイミド誘導体、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(EEDQ)などを用いることができる。この場合、必要に応じて1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾール誘導体を加えてもよい。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

【0040】

反応を非水系で行う場合の溶媒としては、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種(糖化合物で修飾されたカルボキシメチルデキストランポリアルコールの有機アミンの塩及び医薬化合物又は医薬化合物を結合させたスペーサー)を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、N-メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入される医薬化合物残基の量は特に限定されないが、医薬化合物残基の種類、並びに薬物複合体の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1～30重量%、好ましくは2～15重量%程度の範囲を選択することができる。医薬化合物として特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤を用いる場合の導入量は、例えば1～15重量%、好ましくは4～8重量%程度である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

【0041】

例えば、医薬化合物として特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤を用いる場合、この医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えばpH3程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH10程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入した薬物複合体は同等の抗腫瘍効果を有しているが、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと上記医薬化合物を結合させたスペーサー（例えばオリゴペプチドスペーサー）とを反応させる場合に開環型の反応種が反応系に存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行し、著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一な薬物複合体が得られない場合がある。このような副反応は、平衡が達成されない非水系において反応種として閉環体を用いることにより回避することができる。

【0042】

本発明の薬物複合体は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。また、本発明の薬物複合体は優れた血管透過性を有している。腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されているため、オリゴペプチドからなるスペーサーを有する薬物複合体はスペーサー部分で容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が細胞内に移行して薬効を発揮するか、または標的細胞の糖を認識するレセプターを介して薬物複合体が細胞内に取り込まれ、プロテアーゼにより遊離した薬物が薬効を発揮する。

【0043】

また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールは生体内、例えば肝臓、脾臓、又は骨髓などで異物高分子として認識される程度が低い。このため、これらの臓器への移行性が低く、一方、糖化合物の種類に応じて対応の糖レセプターが豊富な臓器には高濃度で分布するという特徴がある。例えば、ガラクトー

スで修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有する本発明の薬物複合体は、肝臓に対して優れた指向性を有している。従って、医薬化合物として抗腫瘍剤を結合した薬物複合体は、肝臓癌の治療に有用である。

【0044】

本発明の薬物複合体を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いて製造される医薬組成物を用いることができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物残基を構成する医薬化合物の投与量、薬物複合体中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定すべきである。例えば、特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤の残基が約6重量%程度の割合で導入された薬物複合体を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 0.1~100 mg程度、好ましくは約 1~30 mgの範囲で一回投与し、3~4週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

【0045】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。実施例中に示したスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された1個又は2個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載した薬物複合体のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、実施例中、DX-8951は(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン（特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤）を意味する。

【0046】

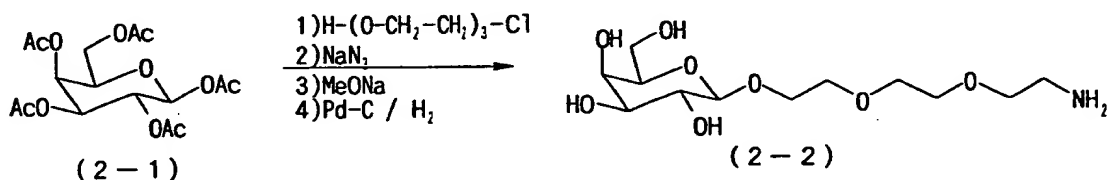
実施例中、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化

度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H⁺) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を $s(\text{mg})$ 、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を $a(\text{ml})$ 、0.1N 塩酸の滴定量を $b(\text{ml})$ とし、カルボキシメチル化度を $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$ の式により求めた。また、薬物の導用量（重量%）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（362 nm 付近）から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った（カラム：TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液：0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40℃）。

【0047】

実施例 1：化合物 2-2 の合成

【化 2】



【0048】

化合物 2-1 (5.0 g) と 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール (3.75 ml) をジクロロメタン (75 ml) に溶かし、3-フルチホウ素エーテル錯体 (7.7 g) を加え、5 時間攪拌した。反応液をジクロロメタン (100 ml) で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル 2:1）で精製し、クロル体を 3.3g 得た。得られたクロル体 (3.3 g) と NaN₃ (2.0 g) を DMF (15 ml) 中で 60℃ で 2 日間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫

酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を2.8g得た。

【 0 0 4 9 】

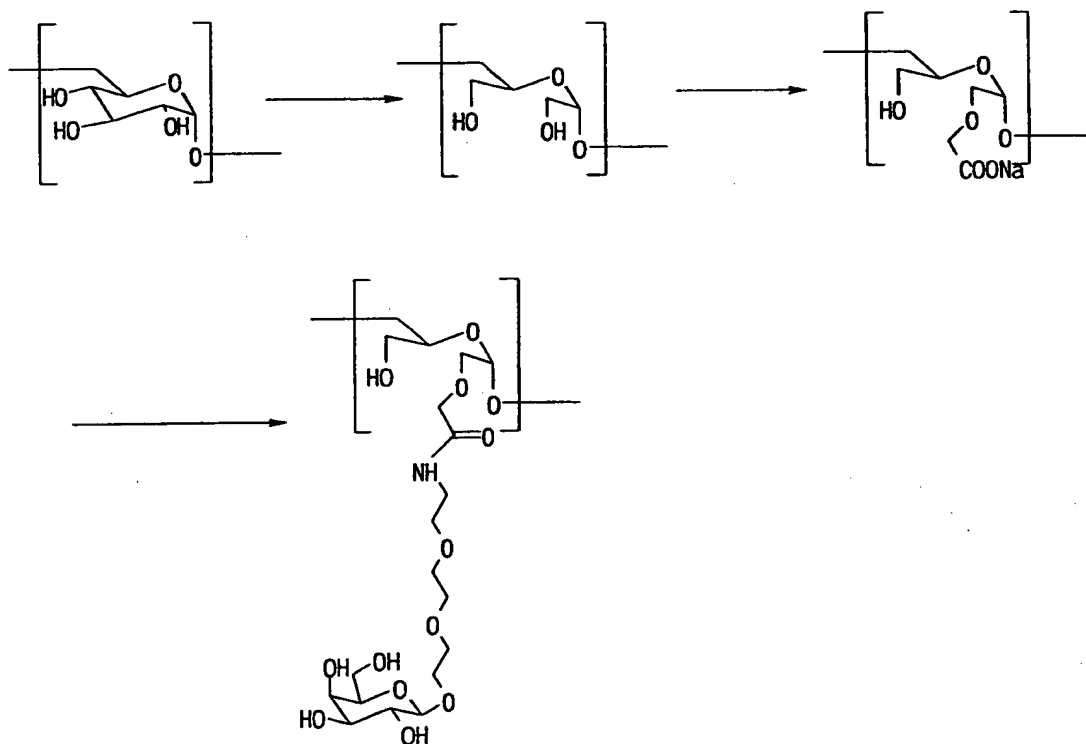
得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液のpHが10になるまで、28% MeONa含有メタノール溶液を加え、1時間攪拌した。反応液にDowex 50W X8(H⁺)を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(2.0 g)を加え、水素常圧下1晩攪拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物2-2を1.2 g得た。

$$^1\text{H-n.m.r. (DMSO-d}_6\text{)}: \delta \text{ 4.20-4.30 (1H, br), 4.00-4.10 (1H, br), 3.80-3.85 (1H, br), 3.50-3.75 (14H, m), 2.75-2.90 (2H, m)}$$

【 0 0 5 0 】

実施例 2：ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールの合成

【化 3】



【0 0 5 1】

デキストラン4(フナコシ社製、平均分子量4000-6000)(20 g)の0.1M 酢酸緩衝液(

pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して4℃で10日間攪拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌した。氷冷して、酢酸でpH5.5に調整し、4℃で1時間攪拌した。氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。以上の行程を2回行い、得られた2つの水溶液を1つにまとめ、バイオマックス-3膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9Kであった。

【0052】

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル(以下、CMと略す)デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。

【0053】

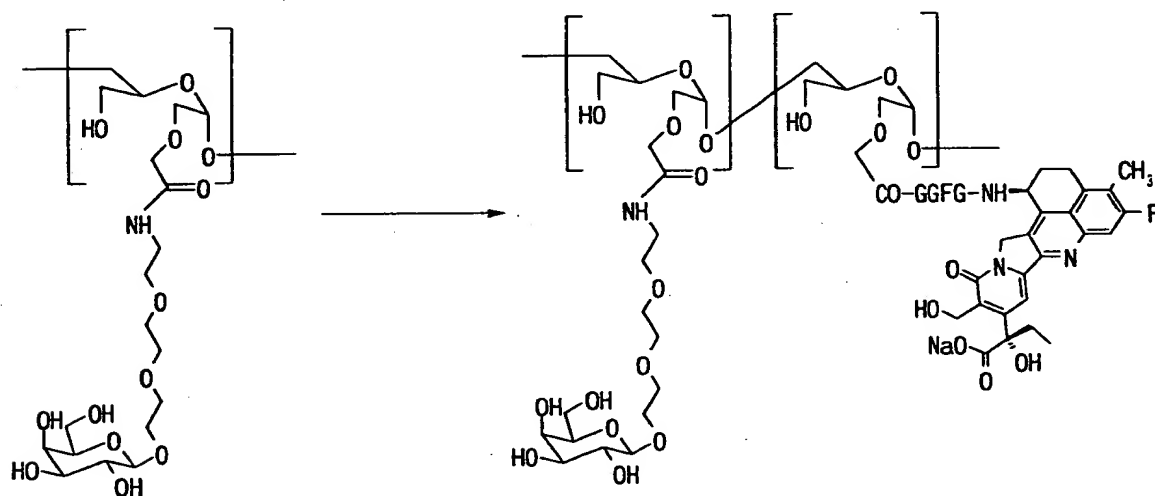
この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14Kであり、糖残基あたりのCM化度はアルカリ滴定から0.7であった。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例1の化合物2-2(800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を

加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (240 mg) を2時間おきに3回添加し、計6時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を1.1 g得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖10残基当たり、1.0の割合であった。

【0054】

実施例3：ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成

【化4】



【0055】

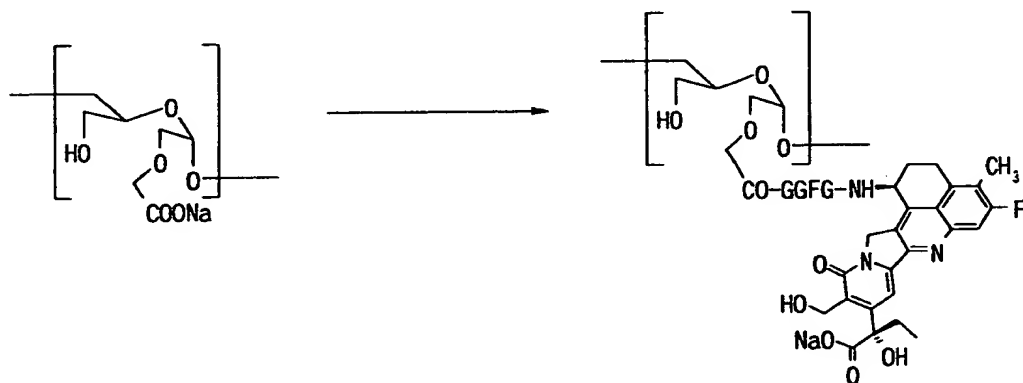
実施例2で得られたガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩 (1.0 g) を水 (30 ml) に溶かし、3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩 (150 mg) と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (35 mg) のメタノール溶液 (40 ml) を加えた。溶液のpHを7.0とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (35 mg) を2時間ごとに、3回加えた後、1晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液 (20 ml) に溶かし、エタノール (100 ml) に滴下し、析出した沈殿を遠心分離 (3500 rpm, 8分) により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22 μ m) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を900mg得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:

東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1Mトリス緩衝液中)をそれぞれ図1及び図4に示す。本化合物中のDX-8951含量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での366 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、4.9% (W/W)であった。

【0056】

参考例1: CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成

【化5】



【0057】

実施例2で得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8(Et_3NH^+)を通し、CMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)と3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(350 mg)を含むN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化

化合物を1.4g得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム: 東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1Mトリス緩衝液中)をそれぞれ図2及び図5に示す。本化合物中のDX-8951含量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での366 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

【0058】

実施例4: ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成

デキストランT500(ファルマシア社製、分子量500K)(50 g)の0.1M 酢酸緩衝液(pH 5.5)(5000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g)の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光して4℃で10日間攪拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晚攪拌した。反応液を氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを6.5に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(70 g)を水(2000 ml)に懸濁させた液を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌した。氷冷して、酢酸でpH5.5に調整し、4℃で1時間攪拌した。氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液を限外濾過膜(1000K、フィルترون社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール(21.1 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、128Kであった。

【0059】

水酸化ナトリウム(13.84 g)を水(150 ml)に溶かして得られる水溶液に上記で得たデキストランポリアルコール(5 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸のナトリウム塩(61.6 g)を加えて溶解させた後室温で一晩反応させた。この反応液のpHを8.5に調整した後、バイオマックス-50膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、428Kであり、糖残基あたりのCM化度はアルカリ滴

定から0.9であった。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(500 mg)を水(50 ml)に溶解し、実施例1の化合物2-2(400 mg)のメタノール(20 ml)溶液と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(160 mg)のメタノール(20 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(120 mg)を2時間おきに3回添加し、計6時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-50膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥し、目的物を600 mg得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖10残基当たり、1.7の割合であった。

【0060】

得られたガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(200 mg)を水(3 ml)に溶かし、3'-N-(Gly-Gly-Phe-Gly)-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(27 mg)のメタノール溶液(3 ml)と1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(7mg)のメタノール溶液(3 ml)を加えた。溶液のpHを7.0とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(7 mg)を2時間ごとに、3回加えた後、1晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(10 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-50膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を180 mg得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl水溶液、流速:0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1Mトリス緩衝液中)をそれぞれ図3及び図6に示す。本化合物中のDX-8951含量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での366 nmにおける吸光度に基づいて定量したところ、3.7% (W/W)であった。

【0061】

試験例1 : C57BL/6 マウスにおける実施例3のガラクトース修飾薬物複合体の集積性実験

【0062】

実施例 3 のガラクトース修飾薬物複合体および対照として参考例 1 の薬物複合体を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951 に換算した濃度が 0.5 mg/ml となるように調製した。これらの薬物複合体水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的 (0.5, 1, 2, 4 および 24 時間) に、肝臓を採取しこれらの薬物複合体量を求めた。

薬物複合体の定量：得られた肝臓の重量に対し水を 5 倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50 μ l に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した α -Chymotrypsin 溶液 450 μ l を添加し、40 $^{\circ}$ C で 2 hr 反応した。その後、50% MeCN 含有 0.5 N HCl 溶液を 500 μ l 添加し、12000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20 μ l を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することで薬物複合体量を求めた。この時、投与に用いた各薬物複合体水溶液を、蒸留水により、50、10、2 μ g/ml に調製し、それぞれ 50 μ l を上述の方法により酵素処理し、G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

【0063】

HPLC 分析条件

カラム：Symmetry C18 (4.6 \times 100mm)

流速：1.0 ml/min

カラム温度：40 $^{\circ}$ C

検出波長：Ex.375 nm、Em.445 nm

溶出液：MeOH : MeCN = 1 : 2 (29%) 0.1 % TFA (71%)

その結果を図 7 に示す。実施例 3 のガラクトース修飾薬物複合体は、参考例 1 の薬物複合体に比べて高い肝臓集積性を示した。

【0064】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の薬物複合体 (実施例 3) の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図 2】 本発明の薬物複合体（参考例 1）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図 3】 本発明の薬物複合体（実施例 4）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

【図 4】 本発明の薬物複合体（実施例 3）の GPC チャートを示す図である。

【図 5】 本発明の薬物複合体（参考例 1）の GPC チャートを示す図である。

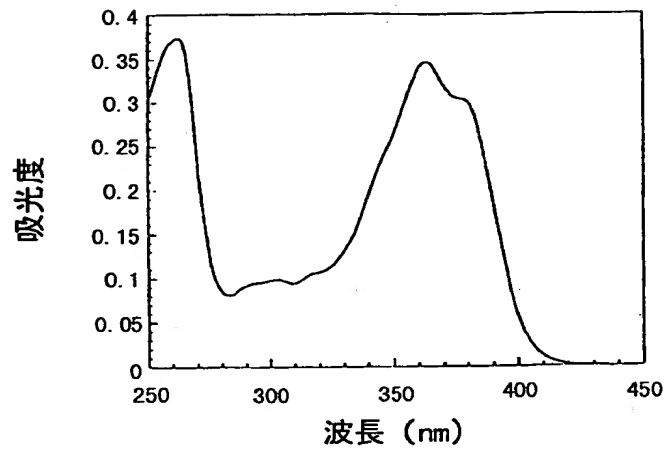
【図 6】 本発明の薬物複合体（実施例 4）の GPC チャートを示す図である。

【図 7】 本発明の薬物複合体（実施例 3、参考例 1）の肝臓への集積性を示す図である。

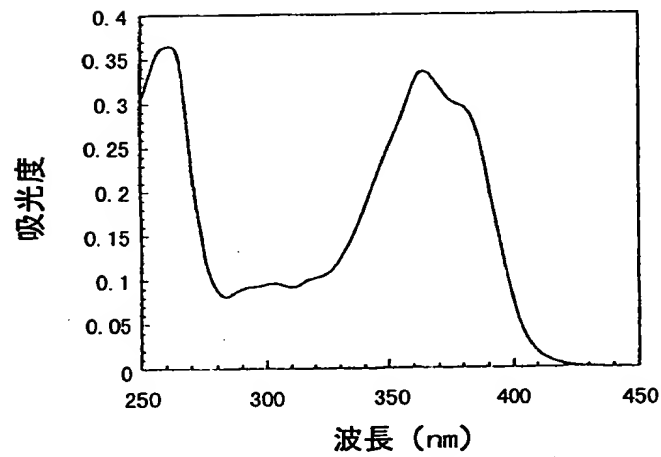
【書類名】

図面

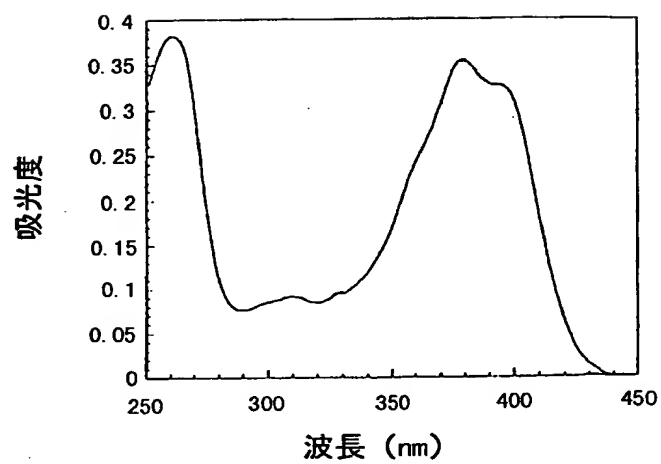
【図1】



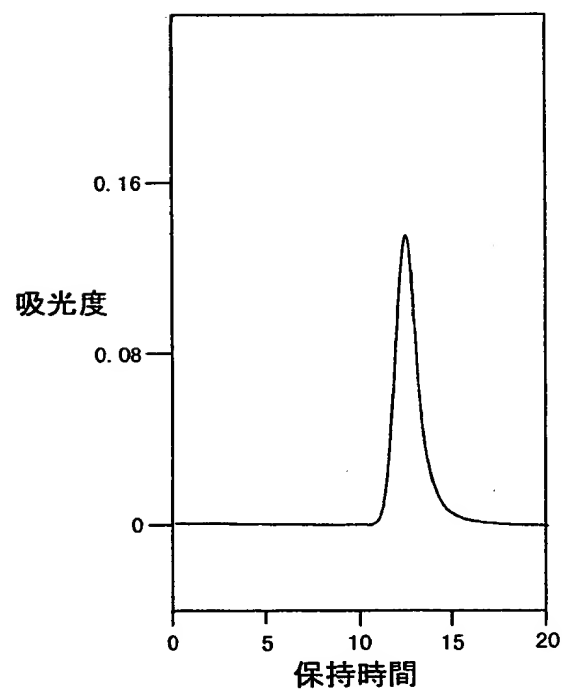
【図2】



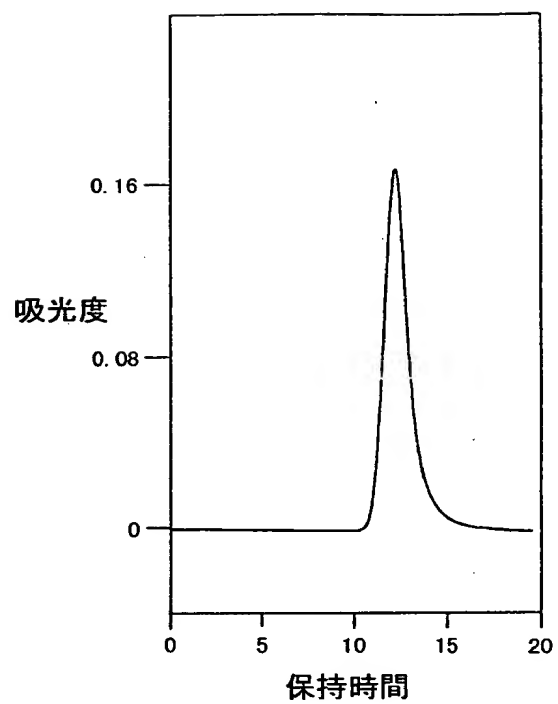
【図 3】



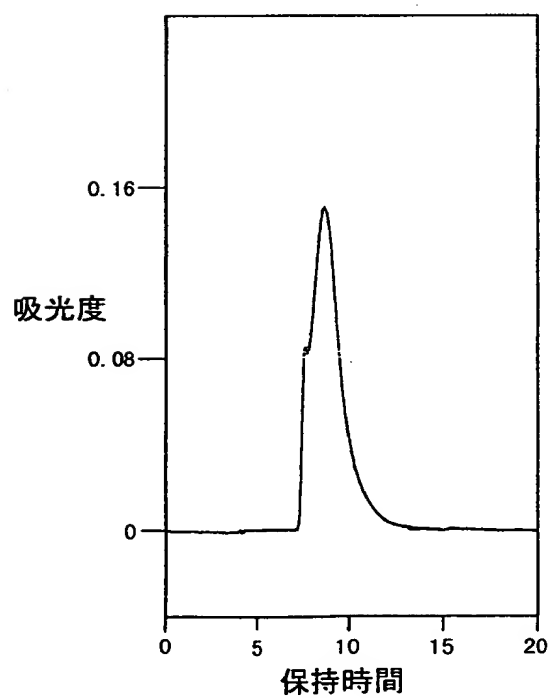
【図 4】



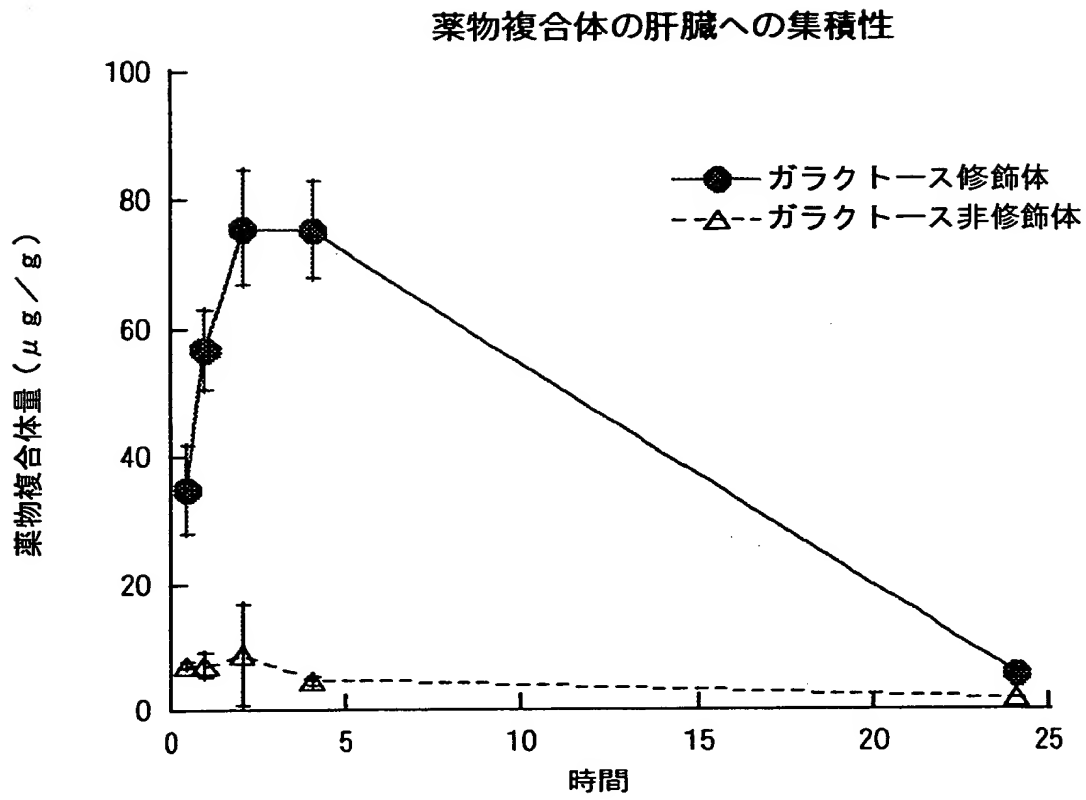
【図 5】



【図 6】



【図7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを薬物担体として含む薬物複合体の臓器指向性を高める手段を提供する。

【解決手段】 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含む薬物複合体。例えばガラクトースなどの糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とは1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合していてもよい。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000002831

【住所又は居所】 東京都中央区日本橋3丁目14番10号

【氏名又は名称】 第一製薬株式会社

【代理人】 申請人

【識別番号】 100096219

【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階
塩澤・今村特許事務所

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階
塩澤・今村特許事務所

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【住所又は居所】 東京都中央区京橋一丁目5番5号 KRFビル5階
塩澤・今村特許事務所

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002831]

1. 変更年月日 1990年 8月28日
[変更理由] 新規登録
住 所 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
氏 名 第一製薬株式会社